

18/5/7
DIALOG(R) File 351: Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009698186

WPI Acc No: 1993-391739/199349

XRAM Acc No: C93-173860

Improved yeast expression system - in which new host can express specific protein, in which expression cassettes are integrated in different chromosomes or same chromosome in same host

Patent Assignee: TONEN CORP (TOFU)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 5292972	A	19931109	JP 91188794	A	19910729	199349 B

Priority Applications (No Type Date): JP 91188794 A 19910729

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 5292972	A	12	C12N-015/14	

Abstract (Basic): JP 5292972 A

New host can express specific protein, in which expression cassettes are integrated in the different chromosomes or different sites of the same chromosome in the same host. Expression cassette contains promoter and DNA that encodes fused and specific protein in the downstream. Host is cultured, followed by collecting specific protein from the culture. Pref. (1) host is yeast; (2) promoter is modified promoter, that contains yeast alcohol dehydrogenase I promoter, and a part of yeast glyceryl aldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter, and it exists in different expression cassette; (3) protein is human serum albumin; (4) expression cassette integrating site is leu 2 or his 4 position, on the yeast chromosome; (5) second expression is introduced with human serum albumin high expressible plasmid pRGU-N7-TLy 1; (6) to yeast that contains the first expression cassette fused with yeast alcohol dehydrogenase promoter and prepro-human serum albumin cDNA, at his 4 position, the second expression cassette is introduced to the expression plasmid pRGU0N7-TLy 1; (7) first expression cassette contg. yeast can produce human serum albumin efficiently, by mutation; (8) the mutant is 222 strain; (9) the host is respiratory activity deleted strain; (10) the high respiratory ability and high human serum albumin producible host is obtd., by conjugation of the strain (9) with high respiratory activity and highly growtable yeast strain; and (11) the specific protein is human serum albumin.

USE/ADVANTAGE - Expression amt. increase to 4 fold.

Dwg.0/0

Title Terms: IMPROVE; YEAST; EXPRESS; SYSTEM; NEW; HOST; CAN; EXPRESS; SPECIFIC; PROTEIN; EXPRESS; CASSETTE; INTEGRATE; CHROMOSOME; CHROMOSOME; HOST

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/14

International Patent Class (Additional): C12N-001/19; C12N-015/81

File Segment: CPI

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-292972

(43) 公開日 平成5年(1993)11月9日

(51) IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/14				
1/19		9050-4B		
15/81		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数13(全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平3-188794	(71) 出願人	390022998 東燃株式会社 東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)7月29日	(72) 発明者	八木 慎太郎 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	柳田 光昭 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	鈴木 正則 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内
		(74) 代理人	弁理士 久保田 耕平 (外5名)

(54) 【発明の名称】 改良された酵母発現系

(57) 【要約】

【構成】 プロモーターとその下流に融合した特定の蛋白質をコードするDNAを含んで成る複数の発現カセットが同一の宿主中の異なる染色体又は同一の染色体の異なる部位に組込まれている、該蛋白質を発現することができる宿主、並びにその宿主を用いての該蛋白質の製造方法。宿主として酵母を、特定の蛋白質としてヒト血清アルブミンを、プロモーターとして酵母グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの一部を含む改良プロモーター、及び酵母アルコールデヒドロゲナーゼIプロモーターを用いる場合を例示する。

【効果】 上記具体例において、発現量が約4倍に増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プロモーターとその下流に融合した特定の蛋白質をコードするDNAを含んで成る複数の発現カセットが同一の宿主中の異なる染色体又は同一の染色体の異なる部位に組込まれている、該特定の蛋白質を発現することができる宿主。

【請求項2】 前記宿主が酵母菌である、請求項1に記載の宿主。

【請求項3】 前記プロモーターが酵母アルコールデヒドロゲナーゼIプロモーター、及び酵母グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの一部を含む改変プロモーターであり、これらが異なる発現カセット中に存在する、請求項1又は2に記載の宿主。

【請求項4】 前記蛋白質がヒト血清アルブミンである、請求項1～3のいずれか1項に記載の宿主。

【請求項5】 前記発現カセットが組込まれている部位が酵母染色体上の leu2 座又は his4 座である、請求項1～4のいずれか1項に記載の宿主。

【請求項6】 第二の発現カセットがヒト血清アルブミン高発現プラスミド pRGU-N7-Tly1 を用いて導入されたものである、請求項1に記載の宿主。

【請求項7】 酵母アルコールデヒドロゲナーゼプロモーターとプレプロヒト血清アルブミンcDNAとが融合された第一の発現カセットを his4 座位に含む酵母菌に、請求項6に記載の発現プラスミドにより第二の発現カセットが導入されている、宿主。

【請求項8】 前記第一の発現カセットを含む酵母菌が、突然変異によりヒト血清アルブミンを効率よく産生するようになったものである、請求項7に記載の宿主。

【請求項9】 前記第一の発現カセットを含む酵母変異株が 222 株である、請求項8に記載の宿主。

【請求項10】 呼吸能欠損株である、請求項7～9のいずれか1項に記載の宿主。

【請求項11】 請求項10に記載の呼吸能欠損株と、呼吸活性が高く且つ増殖能の高い酵母株との接合により得られる、呼吸能が高く且つヒト血清アルブミンの生産能が高い宿主。

【請求項12】 請求項1～11のいずれか1項に記載の宿主を培養し、そして培養物から特定の蛋白質を採取することを特徴とする、特定の蛋白質の製造方法。

【請求項13】 前記特定の蛋白質がヒト血清アルブミンである、請求項12に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、特定の蛋白質を効率よく産生することができる発現宿主、及び該宿主を用いた特定の蛋白質の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 酵母を宿主として外来遺伝子産物を高効率で産生させるために、外来遺伝子を発現する遺伝子数

を増加させるなどの方法が試みられている。しかしながら、外来遺伝子産物は酵母にとり異物であるため、それを発現遺伝子の数を増加させることにより高効率で発現させようとする、酵母にストレスがかかり、酵母の生育が阻害される、例えば液胞が肥大化するような酵母の細胞内器官が異常になる、酵母が死滅、破裂しやすくなるなどの問題が生じる。

【0003】 また目的物である遺伝子産物を容易に精製して得るためには、それを菌体外に効率良く分泌させることが必要であるが、上記のような方法をとるならば、上記の問題点に加え、菌体外に分泌されず菌体内に蓄積する、分泌された蛋白質が分解されやすくなるなどの問題が生じる。一方異種蛋白質を大量に生産するためには、その蛋白質を生産する酵母を大量に培養することが好ましい。その際、もっとも短時間でかつ高い対糖収率で増殖させるためには、酵母を嫌氣的呼吸（醗酵）で生育させるのではなく、酸素吸収により生育させる必要があり、そのための増殖制御方法も多数開発されている。しかしながら酵母のなかには、ミトコンドリアDNAの変異により酸素呼吸が不可能な菌株も多く知られており、実験室株として著名な AH22 株もミトコンドリアDNAに変異を持つ呼吸欠損株である。このような株を用いた場合にはたとえ菌体当りの異種蛋白質産生量が高いとしても、短時間でかつ高い対糖収率で菌体を生育させることは困難であり、そのため高い対糖収率で異種蛋白質を生産することは困難となる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 したがって本発明は、同一の宿主の染色体に複数の発現カセットを組み込み、組み込んだ場合に、異種蛋白質産生に伴う弊害が生じず、また高密度大量培養化を目的とした培養に供することが出来、且つ外来蛋白質を効率良く発現させることを目的とするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 従って本発明は、プロモーターとその下流に融合した特定の蛋白質をコードするDNAを含んで成る複数の発現カセットが、同一の宿主中の異なる染色体、あるいは同一の染色体の異なる部位に組み込まれており、該特定の蛋白質を障害なく効率良く分泌発現することができ、酸素呼吸能を持つ宿主、並びにこの宿主を用いて分解されることなく該蛋白質を製造する方法に関する。

【0006】

【具体的な説明】 本発明において好ましい宿主は酵母であり、宿主として酵母を用いる場合について具体的に説明する。本発明において用いるプロモーターは、選択された宿主細胞中で機能することができるものであり、宿主が酵母の場合、例えば PGK プロモーター、ADH2 プロモーター、GAL1-10 プロモーター、PHO5 プロモーターや、人工DNA配列又は異種DNA断片由来の酵母で

プロモーター機能を持つ断片等が使用できる。好ましくは発現カセットごとに異なるプロモーターを使用する。本発明においては、具体例として、一方のプロモーターが酵母アルコールデヒドロゲナーゼI (ADHI) プロモーターであり、他方のプロモーターが酵母グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(TDH3) プロモーターの一部を含む改変プロモーターを使用する。

【0007】本発明の特定の蛋白質としては、プロテインジスルフィドイソメラーゼなどの酵素インターロイキン2、ヒトインターフェロンなどのリンホカイン、肝細胞増殖因子などの各種増殖因子、成長ホルモンなどのポリペプチドホルモン等、種々の蛋白質を挙げることができる。具体例としてヒト血清アルブミンについて記載する。

【0008】1) 高発現ベクターの作成

酵母に外来遺伝子を導入し、発現させるには、酵母において高い転写能力を持つプロモーターの下流に、目的の外来遺伝子を連結させ、導入するのが望ましい。そのため本発明においては、まず、強力なプロモーターの制限のもとにあるヒト血清アルブミン遺伝子が染色体に組込まれている酵母宿主を用意し、次にこれに第二の発現カセットを挿入する。

【0009】このようなプロモーターとして、酵母のGAPDHの遺伝子の一つであるTDH3遺伝子の上流活性化配列(UAS)と、同遺伝子のTATA配列、CAAT配列などから構成される転写開始領域から成り立ち、強力な転写能力を持つプロモーターUAS1-N7(特願平3-106600号)を用いる。また新たに導入するHSA遺伝子としては、酵母に適したコドンから成り立つリーダー配列を付加することによって改変したHSA遺伝子であるHSA-A遺伝子(特開平2-117384号)を用いる。また転写終了配列としては、酵母アルコールデヒドロゲナーゼI (ADHI) 遺伝子の転写終了配列を用いる。

【0010】また新たに酵母に導入する発現遺伝子は、染色体と遊離したプラスミドの形にして導入すると、その形質転換体を培養している間にプラスミドが脱落してしまい、安定にHSAを産生し続けることができなくなることが考えられるため、導入する遺伝子は、染色体に組み込ませることが望ましい。そのため、これらのプロモーター、HSA遺伝子及びADHI遺伝子の転写終了配列を連結させたものを、酵母組み込み型ベクターpRS305に導入することにより、酵母のleu2遺伝子座に組み込むことが可能なHSA発現プラスミドpRG-UAS1-N7-TLY1-305を作成する。このHSA発現プラスミド作成の詳細については実施例1に記載する。

【0011】

2) 高分泌株へのHSA高発現プラスミドの導入

pRG-UAS1-N7-TLY1-305をClaIで切断したものを用いて、HSA高分泌変異株である222株(特願平3-110775号; 微工研菌寄第12186号)を形質転換することによ

り、222株のleu2遺伝子座にこの発現プラスミドを組み込ませることができる。ここで用いた変異株、222株は、AH22株のhis4遺伝子座に酵母ADHI遺伝子のプロモーターを利用したHSA発現プラスミドを導入して得られたHIS23株にEMS(エチルメタンスルホン酸)を用いた変異処理を施すことにより得られたHSAを高分泌するようになった株である(特願平3-110775)。

【0012】形質転換株は、ロイシンの非要求性を指標に選択する。得られた形質転換体のHSA生産能は、YPD培地中に分泌されたHSAをSDS-PAGEにより分析することにより調べる。この新たな発現ベクターの導入により得られた株、U1N7TLY1/222株は、元の222株の倍以上の量のHSAを培地に分泌する能力を持っていた。これらの実験の詳細は実施例2に記載した。

【0013】3) 接合による株の創製

AH22由来の222株は、ミトコンドリアDNAに変異を持つ ρ^- 株であるため、エタノール資化能を持たない所謂呼吸欠損株である。そのため、菌体の高密度培養に適した株ではない。故に222株の形質転換体であるU1N7TLY1/222株も同様に高密度培養に適した株とはいえない。この性質を補うためには、例えば接合により、正常なミトコンドリアDNAを持つミトコンドリアを導入する必要がある。

【0014】しかしながら、接合を行なうことにより、呼吸欠損が補われるのみでなく、接合に供する相手株の好ましくない形質も導入される可能性があるため、供する株を選ぶ必要がある。そのような株の候補としては、以下のような形質を持つことが好ましい。高密度化を図るためには、増殖能力が高い株が望ましく、またHSAの生産を行なうためには、例えばプロテアーゼなどが分泌されにくい株が好ましい。また当然呼吸欠損でない株であることは必須である。このような株として本発明においてはA8207BNK1株(ATCC.52299)を用いる。

【0015】UAS1+N7/222株とA8207BNK1株を接合させ、2倍体を得る。これを胞子形成培地に移すことにより胞子を作らせ、得られた胞子を持つ20個の子囊から80個の胞子を単離する。これらの胞子由来株から、HSAを多く生産し、且つヒスチジンの要求性を持たない株をニトロセルロース膜を用いたHSAの検出方法と、SDS-PAGEを用いた分泌HSAの定量方法を用いて評価することにより、222株の形質である高いHSA生産能を持ち、かつ呼吸能を持つ株を選択する。

【0016】これらの操作の結果、本発明の提供する株、YY9C株とYY12A株を得た。なおこれ等の実験の詳細については、実施例3、4、5に記載したが、YY9C株、及びYY12A株は元の222株の3倍以上のHSAを培地に分泌する能力を持っていた。また、222株が利用することのできなかつた非発酵性の炭素源であるグリセロール、乳酸、エタノールを利用し増殖することが可能であり、くわえて、これらの炭素源を利用してH

5

SAを生産することもできる。

【0017】なお、これらの酵母株、*Saccharomyces cerevisiae* YY9Cは工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第12369号として寄託されており、*Saccharomyces cerevisiae* YY12Aは同様に微工研菌寄第12370号として寄託されている。

【0018】

【実施例】次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. HSA発現ベクターpRG-UAS1-N7-TLY1-305の作成

制限酵素処理方法の詳細、制限酵素断片の調整方法の詳細、T4 DNAリガーゼを用いた連結、環状化反応の詳細、大腸菌の形質転換、形質転換体の選択、形質転換体の持つプラスミドDNAの検定などについては、一般的な実験としてまとめて最後に記載した。

【0019】TDH3の欠失変異プロモーターを有する pXX05から単離された約0.6 kbのHindIII-XhoI断片を、プロモーター検定ベクターpJDB-NeoC-ATE のHindIII-XhoIサイトに挿入したプラスミド（詳細は特願平3-106000に記載済み）、pXX05-NeoC-ATEをHindIIIとSalIで切断し、TDH3遺伝子のプロモーター断片とネオマイシン耐性遺伝子とADE1遺伝子のターミネーターを含む2 kbの断片を調整した。

【0020】この断片をHindIIIとXhoIで切断したpRS305 (SikorskiとHieter, Genetics, 122, p19-27, 1989)とT4 DNAリガーゼを用いて連結・環状化させ、その反応液を用いて大腸菌XL1-Blue (Stratagene社)を形質転換させ、アンピシリン耐性コロニーを選択することにより目的とするプラスミドpXX05-NeoC-305を含むクローンを得た。次にHSA発現プラスミドであるpJDB-ADH-n HSA-A(特開平3-22984)をXhoIとBamHIで切断し、HSAのcDNAを含む2 kbの断片を単離した。この断片とXhoIとBamHIで切断したpXX05-NeoC-305の大断片とをT4 DNAリガーゼを用いて連結・環状化させた。

【0021】この反応液を用いて大腸菌XL1-Blueを形質転換させ、アンピシリン耐性コロニーを選択することにより目的とするプラスミドpXX05-Ly0-305を含むクローンを得た。次に、UAS検定ベクターpRG-N7L-LacZCのHindII, BglIIサイトに、TDH3遺伝子のUAS領域を持つプラスミドpUAS1から単離した約150bpのHindIII-BglII断片を挿入することによって作成したTDH3遺伝子の改変プロモーター断片UAS1-N7を持つプラスミド（詳細は特願平3-106600に記載済み）、pRG-UAS1-N7-LacZCをNotIとXhoIで切断し、1.5 kbの断片を単離した。

【0022】一方pXX05-Ly0-305をNotIとXhoIで切断し10 kbの断片を単離し、上記1.5 kbの断片とT4 DNAリガーゼを用いて連結・環状化させた。この反応液を用いて大腸菌XL1-Blueを形質転換させ、アンピシリン耐性コロ

6

ーを選択することにより目的とするプラスミドpRG-UAS1-N7-Ly0-305を含むクローンを得た。

【0023】改変リーダー配列を持つHSA遺伝子発現ベクター、pJDB-ADH-HSA-A(特開平2-117384)をXhoIとBamHIで切断し、2 kbの断片を単離した。この断片をXhoIとBamHIで切断したベクターpT3T7-U19X(特開平2-222689)とT4 DNAリガーゼを用いて連結・環状化させ、この反応液を用いて大腸菌XL1-Blueを形質転換させ、アンピシリン耐性コロニーを選択することにより目的とするプラスミドpLY1-37を含むクローンを得た。pLY1-37をEcoRIで切断し、フェノール抽出、エタノール沈殿法によりDNAを純化した後、XhoIリンカー(5'-AATTGCTCGAGC)とT4 DNAリガーゼを用いて連結・環状化させた。この反応液に1/10反応液分の0.5 M NaClを加え、68℃、10分処理した後、EcoRIで再切断した。

【0024】この反応液を用いて大腸菌XL1-Blueを形質転換させ、アンピシリン耐性コロニーを選択することにより目的とするプラスミドpLY1X-37を含むクローンを得た。このプラスミドをHindIIIで切断した後、68℃、10分処理し、ヌクレオチド混合液(1 mM ATP, 1 mM TTP, 1 mM GTP, 1 mM CTP)を1/10容、2 UのDNAポリメラーゼ(クレノー断片)を加え、37℃、15分間処理することにより、HindIII切断末端を平滑末端化させた。

【0025】フェノール抽出、エタノール沈殿法によりDNAを純化した後、XhoIで切断し、2 kbの断片を単離した。この断片をSmaIとXhoIで切断したpT3T7-U18X(特開平2-222689)とT4 DNAリガーゼを用いて連結・環状化させ、この反応液を用いて大腸菌XL1-Blueを形質転換し、アンピシリン耐性コロニーを選択することにより目的とするプラスミドpTLY1を含むクローンを得た。

【0026】次にこのプラスミドをXhoIとBamHIで切断し、1.8 Kbの断片を単離した。またpRG-UAS1-N7-Ly0-305をXhoIとBamHIで切断し8 Kbの断片を単離した。これらの断片をT4 DNAリガーゼを用いて連結・環状化させ、この反応液を用いて大腸菌XL1-Blueを形質転換させ、アンピシリン耐性コロニーを選択することにより目的とするプラスミドpRG-UAS1-N7-TLY1-305を含むクローンを得た。

【0027】実施例2. 222株の改良

HSA高分泌変異株、222株(特願平3-110775)をYPD培地(1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース)で1夜培養し、そのうちの0.1 mlを5 mlのYPD培地に接種した。OD600が1.0に達するまで培養した後、遠心により菌体を集め、集めた菌体を0.5 mlの0.1 M酢酸リチウム液(0.1 M酢酸リチウム、10 mMトリス塩酸[pH7.5]、1 mM EDTA)にて1回洗った。再度遠心により菌体を集め、70 μlの0.1 M酢酸リチウム液に再懸濁し、30℃、1時間保温した。

【0028】ClaIで切断することによって直鎖状にした発現プラスミドpRG-UAS1-N7-TLY1-305のDNAを5 μg

7

加えた後、30℃、30分保温した。500 μ lのPEG溶液（40%ポリエチレングリコール〔平均分子量4,000〕を含む0.1M酢酸リチウム液）を加え、ピペットマンを用いてよく混合した後、45分、30℃で保温した。

【0029】この細胞懸濁液を42℃、5分熱処理し、500 μ lの滅菌水を加えた後、遠心により菌体を集め、100 μ lの滅菌蒸留水に再懸濁した後、SD（-Leu）寒天培地（20 μ g/mlアデニン硫酸塩、20 μ g/mlアルギニン塩酸塩、20 μ g/mlメチオニン、20 μ g/mlヒスチジン硫酸塩、20 μ g/mlトリプトファン、20 μ g/mlウラシル、30 μ g/mlイソロイシン、30 μ g/ml塩酸塩リジン、30 μ g/mlチロシン、50 μ g/mlフェニルアラニン、

表1

菌 株	HSA分泌量	HSA分泌量
	(24時間培養)(mg/l)	(48時間培養)(mg/l)
222株	2.48	2.92
U1N7TLY1/222 株	5.88	6.66

【0032】実施例3、U1N7TLY1/222 株の改良
YPD寒天培地（2%寒天を含むYPD培地）に形成させたU1N7TLY1/222 株のコロニーを白金耳でかきとり、同じくYPD寒天培地に形成させたA8207BNK1株（ATCC、52299）の白金耳でかきとったコロニーを、YPD寒天培地上で混合した後、30℃、4時間培養することにより接合させた。培養終了後、白金耳で寒天培地上にコロニーを形成するように広げ、30℃、2日間増殖させた。

【0033】形成したコロニーの菌体を位相差顕微鏡で観察し、倍数体の形態を持つ菌体からなるコロニーを選択した。この倍数体コロニーを前孢子形成寒天培地（0.8%酵母エキス、0.3%ペプトン、10%グルコース、2%寒天）上に移し、30℃、24時間培養した。さらにこれらの菌体を孢子形成寒天培地（2%酢酸カリウム、2%寒天）上に広げ、30℃、2日間培養することにより、孢子を形成させた。

【0034】孢子形成した子嚢、20個から、マイクロマニピュレーターを用いて80個の孢子をYPD寒天培地上に分離し、30℃、2日間培養することによりコロニーを形成させた。これらのコロニーのうち、SD（-His）寒天培地（20 μ g/mlアデニン硫酸塩、20 μ g/mlアルギニン塩酸塩、20 μ g/mlメチオニン、30 μ g/mlロイシン、20 μ g/mlトリプトファン、20 μ g/mlウラシル、

8

*ン、150 μ g/mlバリン、0.67%アミノ酸不含イーストニトロゲンベース、2%デキストロース、2%寒天）にひろげ、30℃におき3日間培養することによりコロニーを形成させた。

【0030】コロニーを形成した株から分泌されるHSAの量の定量を、下に示したSDS-PAGEによるHSAの定量方法によって行ない、222株よりも大量のHSAを分泌する株、U1N7TLY1/222 株を得た。U1N7TLY1/222 株の培地中に分泌するHSA量を定量した結果を表1に示す。また比較のために、222株についてもHSA分泌量を定量した結果を示した。

【0031】

20 30 μ g/mlイソロイシン、30 μ g/ml塩酸塩リジン、30 μ g/mlチロシン、50 μ g/mlフェニルアラニン、150 μ g/mlバリン、0.67%アミノ酸不含イーストニトロゲンベース、2%デキストロース、2%寒天）上で育成するものを選択した。

【0035】育成するコロニーを、YPD寒天培地上にのせたニトロセルロース膜の上に移して、30℃で24時間培養し、コロニーから分泌された蛋白質をニトロセルロース膜に吸着させた。このニトロセルロース膜から附着した菌体を蒸留水で洗浄して除去した後、膜を80℃で2時間乾燥させた。この膜上のHSAを下に示した抗体を用いたHSAの検出方法によって検出し、比較的大量のHSAが検出された株をさらに選択した。

【0036】これらの株から分泌されるHSAの量の定量を下に示した、SDS-PAGEによるHSAの定量方法によって行ない、そのうち大量のHSAを分泌生産しているYY12A株、YY9C株を選択した。YY9C株、YY12A株の培地中に分泌するHSA量を定量した結果を表2、表3、表4に示す。また比較のために、222株、U1N7TLY1/222 株についてもHSA分泌量を定量した結果を示した。

【0037】

表2

YDP培地におけるHSA発現量

菌 株	HSA発現量	HSA発現量
	(24時間培養)(mg/l)	(48時間培養)(mg/l)
222株	2.48	2.92
U1N7TLY1/222 株	5.88	6.66
YY9C株	7.62	5.32

9

YY12A株

6.41

10

12.68

【0038】

表3

YPGL培地におけるHSA発現量

菌 株	HSA発現量 (24時間培養)(mg/1)
YY9C株	0.26
YY12A株	0.45

【0039】

表4

YPE培地におけるHSA発現量

菌 株	HSA発現量 (48時間培養)(mg/1)
YY9C株	1.47
YY12A株	4.12

【0040】なお、前記ニトロセルロース膜上のHSA 20
の検出は次のようにして行った。ニトロセルロース膜上
のHSAの検出は、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤ
ギ抗HSA抗体を用いて以下のように行なった。まず、
HSAを吸着したニトロセルロース膜を3%ゼラチンを含
むTBS液(0.5M塩化ナトリウム、20mMトリス-塩
酸緩衝液(pH7.5))中で30分処理した。次にこの膜を
TTBS液(0.05%のTween20を含むTBS液)で5分間処
理し、さらに同じ操作をもう一度行なった後に、1%の
ゼラチンを含むTTBS液で西洋ワサビペルオキシダーゼ標
識ヤギ抗HSA抗体を1000倍に希釈した溶液中に膜を移
30して、8分間振盪した。

【0041】膜をTTBS液で2回、TBS液で1回、それ
ぞれ5分間洗浄した後、0.015%過酸化水素、0.05%
HRP-カラーデベロップメント試薬(バイオラド社)、
20%メタノールを含むTBS液に膜を移して発色反応さ
せた。反応終了後は、膜を蒸留水で洗浄した。

【0042】また、前記SDS-PAGEによるHSA分泌量の
定量は次のようにして行った。HSA分泌酵母株から分
泌されるHSA量をSDS-PAGEによって測定する方法は、
以下にしたがって行なった。まずHSA分泌酵母株を5 40
mlのYPD培地に懸濁し、30℃で24時間培養した。培養
液50μlを新しい5mlの培地(YPD培地、YPGL培地
[1%酵母エキス、2%ペプトン、1%グリセリン、1
%乳酸]、YPE培地[1%酵母エキス、2%ペプト
ン、1%エタノール])に接種し、さらに30℃で培養し
た。培養液を10,000rpmで40秒遠心して得られた培養上
清を125μl分取し、エタノール125μlを加えよく混
合した後、氷中に1時間静置した。

【0043】これを15,000rpmで5分間遠心し、得られ
た沈殿を減圧乾燥させた後、10μlのサンプル液(2% 50
す。

SDS、5%2-メルカプトエタノール、10%グリセリ
ン、0.0625%プロモフェノールブルー、0.0625Mトリス
塩酸緩衝液(pH6.8))に溶解し、100℃中、5分間処
理した。この溶液を4%から20%の勾配ゲル濃度のSD
Sポリアクリルアミドゲルにより電気泳動(Laemmli, N
ature, 277, p680-685, 1970)した後、クマシーブリリ
アントブルーR250で蛋白質を染色した。ゲルを脱色し
た後、HSAに対応するバンドをデンストメーター(TEF
10CO社、TIAS-100)により測定し、標準HSA試料と比較
定量した。

【0044】なお、本発明の実施例において一般的実験
方法は次の通りであった。DNAは以下のような条件で
制限酵素処理した。例えば1μgのDNAを10μlの反
応液中(反応後はメーカーの推奨する条件のものを用い
た)、5ユニットの制限酵素を加え、37℃に1時間保温
した。制限酵素断片を調製するためには、例えば反応終
了した反応液に1/10容のBPP液(50%グリセリン、
0.01%プロモフェノールブルー、50mM EDTA)を加えた
後、0.7%アガロースゲルにのせ電気泳動を行なった。
電気泳動はTAE緩衝液(40mMトリス、20mM酢酸ナトリ
ウム、10mM EDTA、酢酸を用いてpHを8.0に調整したも
の)を用いて行った。

【0045】電気泳動終了後、必要なバンドを切り出
し、GENECLEAN Kit(BIO101社)を用いてゲルからDNA
を回収した。T4 DNAリガーゼを用いた連結反応は、例え
ばゲルから回収したDNA、100ngと10ngのプラスミド
を10μlの反応液(50mMトリス塩酸(pH7.5)、10mM M
gCl₂、10mMチチオスレイトール、1mM ATP)で17ユニ
ットのT4 DNAリガーゼを加え、16℃、1時間保温した。大
腸菌の形質転換はHanahanの方法(p109-135 In D.M.G
lover(ed.), DNA cloning: a practical approach, vo
l.1. IRL Press, Oxford, England, 1985)で行った。

【0046】大腸菌はL培地(0.5%酵母エキス、1%
トリプトン、0.5%塩化ナトリウム)を用いて培養し
た。また大腸菌形質転換体はLamp寒天培地(50μg/ml
アンピシリン、1.5%寒天を含むL培地)によって選択
した。大腸菌形質転換体のプラスミドDNAをミニプレ
パレーション法(例えば、Manatis等、Molecular clon
ing. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laborat
ory, 1982)を用いて調製し、回収したDNAを適当な制
限酵素によって切断し、その切断パターンをアガロース
電気泳動などによって調べることににより、目的とするプ
ラスミドを持つ形質転換体を選択した。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はプラスミドpXX05-NeoC-ATE及びpRS305か
らプラスミドpXX05-NeoC-305の作製過程を示す。

【図2】図2はプラスミドpXX05-NeoC-305及びpJDB-ADH
-nBSA-AからプラスミドpXX05-Ly0-305の作製過程を示
す。

11

【図3】図3はプラスミドpJDB-ADH-nHSA-A及びpT3T7-019XからプラスミドpLY1-37の作製過程を示す。

【図4】図4はプラスミドpLY1-37及びpT3T7-018XからプラスミドpTLY1の作製過程を示す。

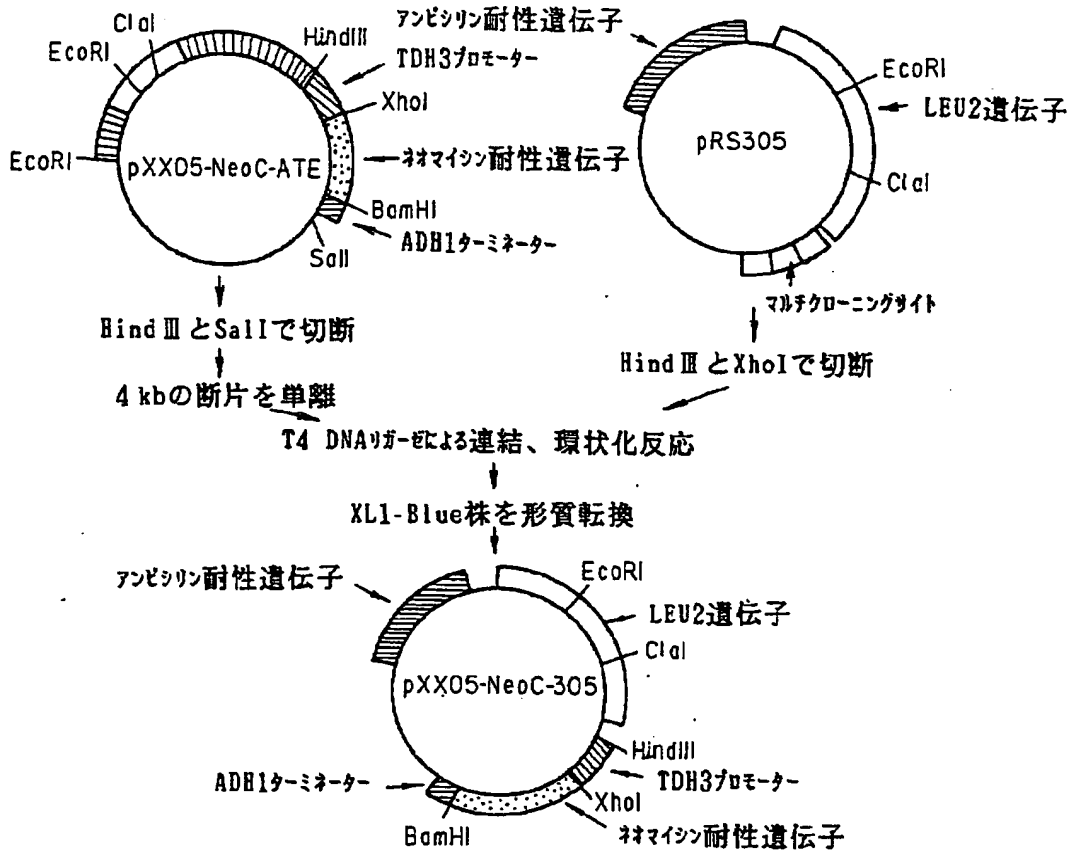
【図5】図5はプラスミドpXX05-Ly0-305及びpRG-USA1

12

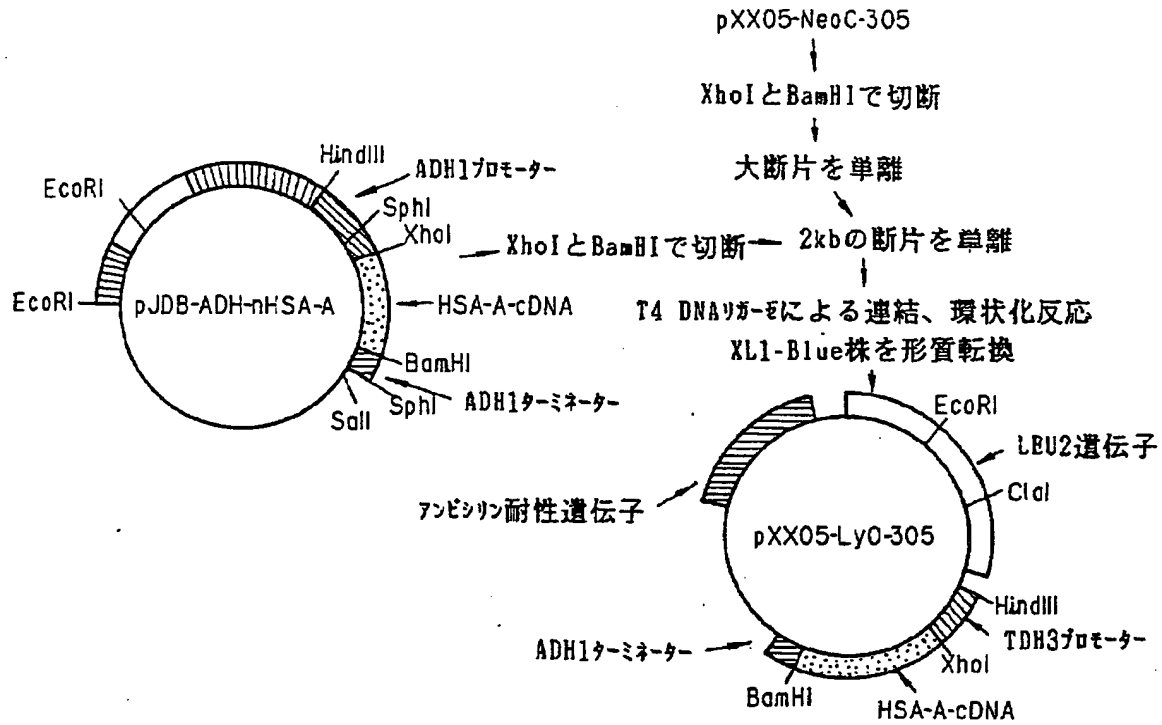
-N7-LacZCからプラスミドpRG-UAS1-N7-Ly0-305の作製過程を示す。

【図6】図6はプラスミドpTLY1及びpRG-UAS1-N7-Ly0-305からプラスミドpRG-UAS1-N7-TLY1-305の作製過程を示す。

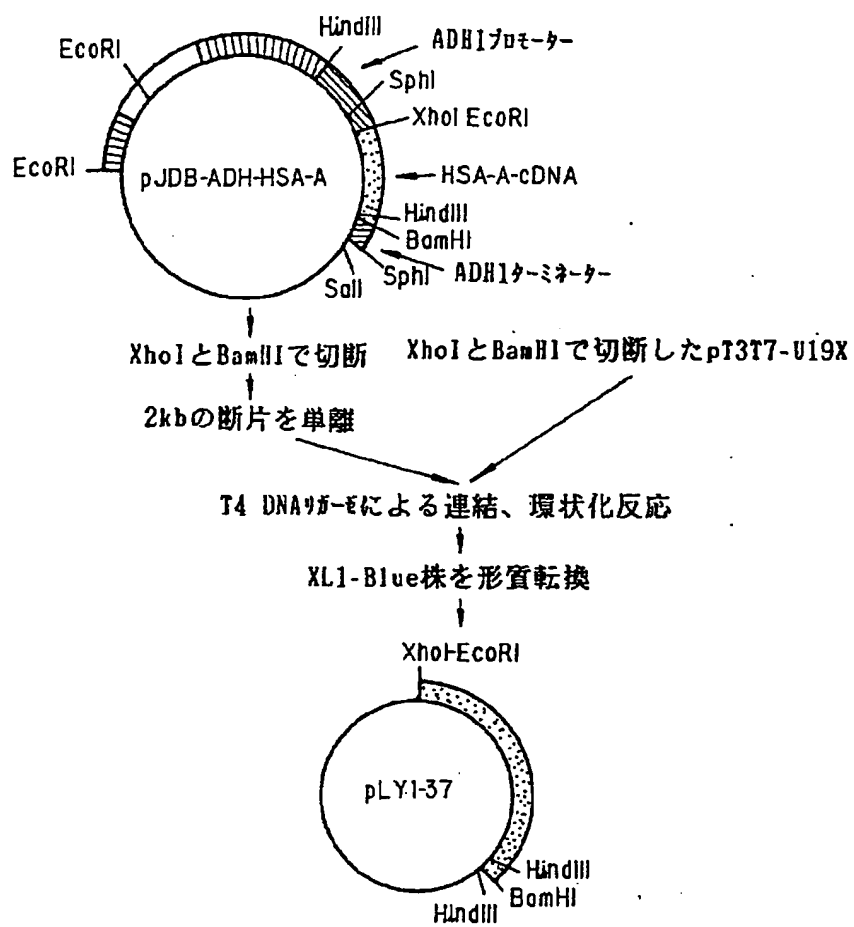
【図1】



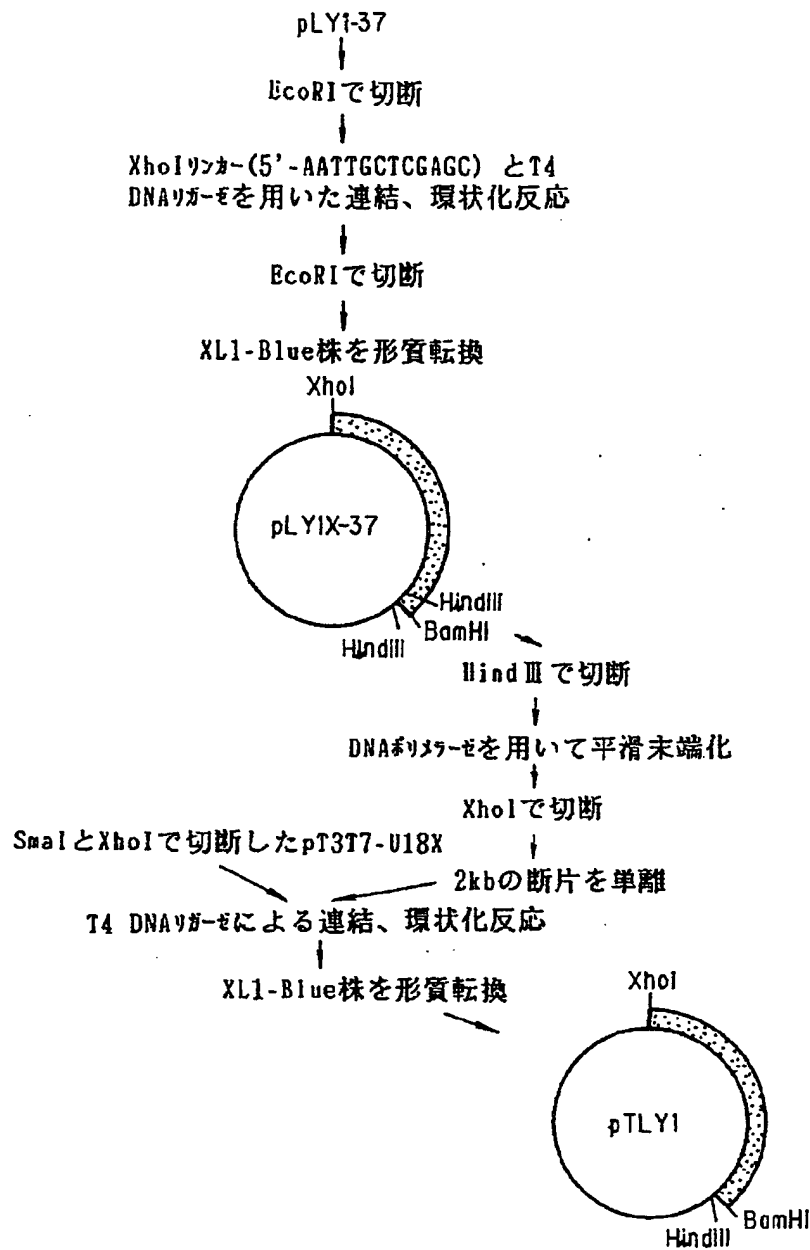
【図2】



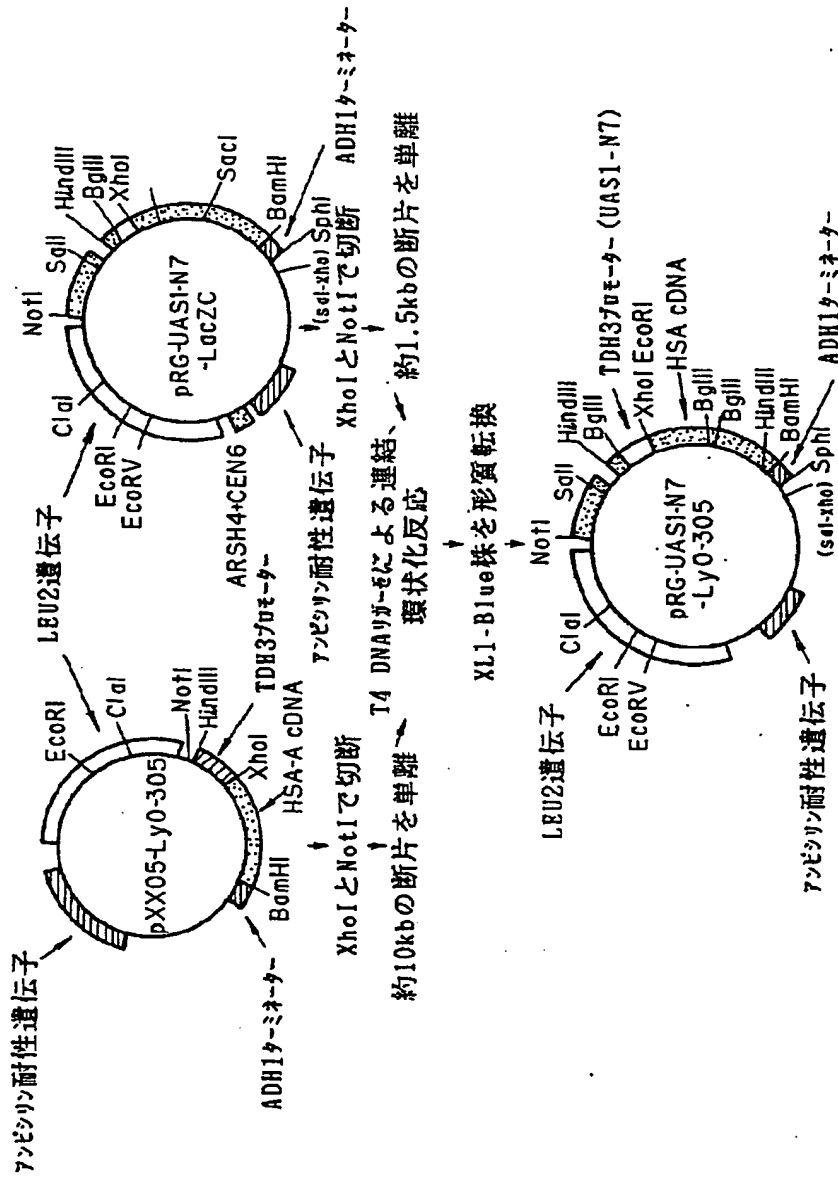
【図3】



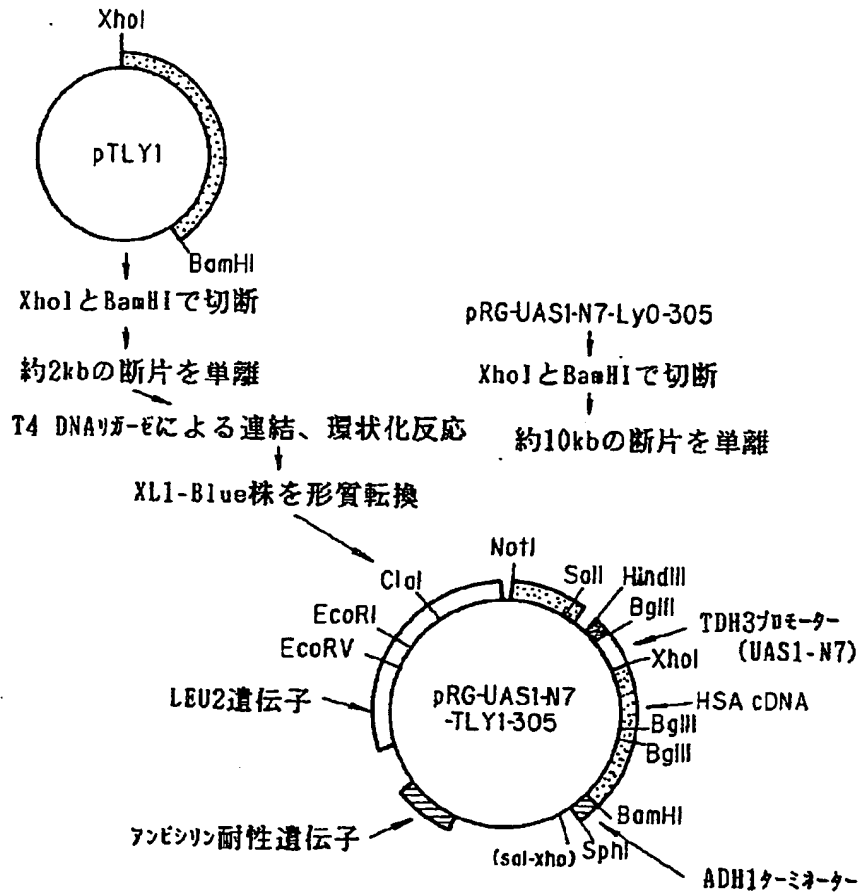
【図4】



【図5】



【図6】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.